

東海大学大学院令和 6 年度博士論文

多血小板血漿に対する凍結融解の影響
と臨床成績の検証

指導 佐藤 正人 教授

東海大学大学院医学研究科
先端医科学専攻

内山 綾香

- ・ この学位論文は、International Journal of Molecular Sciencesに掲載された主要公刊論文を基に作成された。
- ・ International Journal of Molecular Sciences に掲載された主要公刊論文の一部を学位論文に用いることに加えて、学位論文を機関リポジトリ [電子書庫システム] で公開することの承諾を得ている。

【Summary (総括)】

変形性膝関節症 (Osteoarthritis of the knee; OAK) は世界的に患者数が増加している慢性の変性疾患である。軟骨代謝異常、骨棘形成、滑膜炎などを特徴とする慢性の変性疾患であり、疼痛や可動域制限などにより生活の質の著しい低下を引き起こす。

現在 OAK に対する根治的治療法はなく、OAK 患者の多くに対し保存療法が行われ、ごく一部の患者が手術療法を受けている。近年 OAK に対する新たな保存療法の選択肢として注目されているのが、多血小板血漿 (Platelet Rich Plasma; PRP) 療法である。PRP 療法は、患者自身から採取した血液を遠心分離することで得た PRP を関節腔内に投与し、関節疼痛の抑制および軟骨組織の炎症・分解抑制を目的とした医療技術であり、安全で簡便な治療法として急速に普及している。PRP 療法の普及によりさまざまな調製方法が報告されており、調製方法や調製に使用する医療機器(キット化されたもの)によって調製される PRP の性状が異なることが報告されている。また臨床において PRP は、ほとんどの場合調製直後に患部に投与されるが、基礎研究では凍結保存された PRP が多く用いられてきた。PRP に豊富に含まれる血小板は、遠心や凍結、塩化カルシウムなどの刺激に反応して容易に活性化して内包する液性因子を放出し、周辺組織の組織治癒に重要な役割を果たすことが知られている。PRP を凍結保存することにより、血小板活性化状態が変化することで PRP 中の液性因子含有量も変化し、調製直後の PRP と異なる治療効果をもたらす可能性があるがこれまで検討されていない。

本研究では、PRP の凍結処理による抗炎症作用とマクロファージ極性化能に対する影響の検討を目的とした。臨床で使用されている 2 種類の PRP 調製キットを用い、健常者末梢血から Leukocyte-poor PRP (LPPRP) と Autologous protein solution (APS) を調製し、それぞれ一部を -80°C で凍結した。調製直後の PRP (utPRP) と凍結融解を経た PRP (fPRP) 血小板活性化率と液性因子濃度を比較し、軟骨細胞と滑膜細胞に添加して抗炎症作用を、単球由来マクロファージ (MDM) と M1 マクロファージに添加してマクロファージの極性化に対する影響を検証した。さらに東海大学医学部附属病院整形外科の PRP 治療にて、いずれかの utPRP を投与した OAK 患者の臨床評価スコアを比較し、utPRP の OAK に対する治療効果を調査した。

血小板活性化率を比較した結果、LPPRP, APS のいずれにおいても fPRP が utPRP と比較して血小板活性化率が高値であった。液性因子濃度においては、LPPRP では 9 種、APS では 5 種の因子で utPRP と fPRP の間で有意差を認めた。多くの因子において fPRP が utPRP と比較して高濃度であったが、 $\text{TGF } \beta$ は LPPRP, APS とともに fPRP が utPRP と比較して高濃度であった。また TNF-R1 は LPPRP と APS で反対の傾向が観察され、LPPRP が fLPPRP と比較して、fAPS が APS と比較してそれぞれ有意に高濃度であった。軟骨細胞、滑膜細胞に対する PRP 添加の結果、PRP の凍結融解は滑膜細胞や軟骨細胞における炎症性因子と MMP 抑制効果に影響を及ぼすことが明らかとなった。さらに PRP の凍結融解による炎症抑制効果への影響は、LPPRP と APS で異なる可能性が示唆された。健常者末

梢血単球由来マクロファージ、同単球由来 M1 マクロファージの極性化に対する影響においては、PRP の凍結融解は特に液性因子産生に影響を及ぼすことが明らかとなった。東海大学医学部付属病院整形外科にて再生医療等安全性確保法に基づき第 2 種再生医療等提供計画(治療)として実施している PRP 療法にて LPPRP もしくは APS を投与した OAK 患者の臨床評価の結果、投与された PRP により Scored Subscale の変化量や Responder Rate が異なることが明らかとなった。

以上の結果は、PRP 治療の有効性向上、普及、適正使用に貢献し、さらには患者ごとの最適な PRP の選択に寄与する可能性がある。

【Introduction】

変形性膝関節症 (Osteoarthritis of the knee; OAK) の患者数は、我が国においてレントゲン上変化を認めるものは推定 2530 万人、疼痛を有する患者は約 800 万人と報告され、高齢化に伴い患者数は世界的に増加している。OAK は加齢に伴う関節への過負荷、遺伝、肥満、事故やスポーツによる外傷など様々な要因により発症し、軟骨代謝異常、骨棘形成、滑膜炎などを特徴とする慢性の変性疾患であり、疼痛や可動域制限などにより生活の質の著しい低下を引き起こす。OAK 患者の多くは運動療法、薬物療法、関節内へのヒアルロン酸注射やステロイド注射等の保存療法が行われ、ごく一部の患者が関節鏡、高位脛骨骨切り術、人工関節置換術等の手術療法を受けるが、現在 OAK に対する根治的治療法は存在しない。このような状況にある OAK に対し、新たな保存療法の選択肢として最近注目されているのが、多血小板血漿 (Platelet Rich Plasma; PRP) 療法である。PRP 療法は、患者自身から採取した血液を遠心分離することで得た PRP を関節腔内に投与し、関節疼痛の抑制および軟骨組織の炎症・分解抑制を目的とした医療技術である。PRP の関節内注入は、自身の血液を用いるためアレルギー等の副作用リスクが低く、細胞培養などの複雑な操作を必要としないことから、安全で簡便な治療法として急速に普及している。

PRP 療法は、PRP 中の抗炎症性サイトカインや成長因子が関節内の炎症抑制と組織修復を促進することにより OAK の症状改善に寄与すると考えられている。PRP 療法の普及によりさまざまな PRP の調製方法が報告されており、調製方法や調製に使用するキット化された医療機器によって調製される PRP に含まれる血球細胞や液性因子の組成が異なることが報告されている。臨床において PRP は、ほとんどの場合調製直後に患部に投与されるが、基礎研究では凍結保存された PRP が多く用いられてきた。PRP に豊富に含まれる血小板は、物理的刺激や化学的刺激に反応して容易に活性化して内包する液性因子を放出し、周辺組織の組織治癒に重要な役割を果たすことが知られている。先行研究により、遠心分離速度や凍結保存条件が血小板活性と液性因子放出に影響することが報告されている。PRP の調製過程における遠心や保存状態が血小板活性化状態に影響して PRP 中の液性因子含有量に変化し、異なる治療効果をもたらす可能性があるがこれまで検討されていない。

本研究では、PRP の凍結処理による炎症抑制効果とマクロファージ極性化能に対する影響の検討を目的とした。臨床で使用されている 2 種類の PRP 調製キットを用い、健常者末梢血から Leukocyte-poor PRP (LPPRP) と Autologous protein solution (APS) を調製し、それぞれの一部を -80℃ で凍結した。調製直後の PRP と凍結融解を経た PRP において血小板活性化率と液性因子濃度を比較し、軟骨細胞と滑膜細胞に添加して炎症抑制効果を、単球由来マクロファージ (MDM) と M1 マクロファージ

ジに添加してマクロファージの極性化に対する影響を検証した。さらに東海大学医学部附属病院整形外科の PRP 治療にて、調製直後の LPPRP もしくは APS のいずれかを投与した OAK 患者の臨床評価スコアを比較し、調製直後の PRP の OAK に対する治療効果を調査した。

【Discussion (考察と展望)】

本研究では、PRP は凍結することにより血小板活性化率と液性因子濃度が変化し、標的細胞に対する影響が変化することを示した。また PRP の凍結融解が標的細胞に与える影響の変化は PRP の性状により異なることが明らかとなった。

OAK は、炎症性サイトカインやマトリックスメタロプロテアーゼなどにより引き起される組織の炎症と軟骨分解のアップレギュレーションによって発症、進行する。OAK に対する PRP 療法は、PRP に豊富に含まれる抗炎症性因子や成長因子の作用により、炎症と軟骨破壊のバランスを整えることで、疼痛やその他の症状を軽減させると考えられている。そのため PRP 中の液性因子は治療効果に大きな影響を及ぼすと考えられることから、これまでも活発に議論されてきた。臨床試験報告においては、PRP の有効性を支持する報告が多い一方で、否定的な結果も報告されている。これら差異は、それぞれの研究で使用された PRP の調製方法や使用された PRP の性状などが異なることに起因する可能性がある。さらに同種の PRP であっても、基礎研究においては凍結保管や活性化処理を行った PRP が使用される一方、臨床においては調製直後の PRP が投与される場合が多い。血小板は凍結保管によっても活性化し液性因子を放出することが知られているため、両者の結果が一致しない可能性が示唆されるが、その影響はこれまでほとんど検証されていなかった。

本研究では、異なる臨床用 PRP 調製用キットを用いて調製した 2 種類の PRP (LPPRP, APS) を使用し、凍結融解による血小板活性化と液性因子の変化を検証した。また、PRP の凍結融解による滑膜細胞と軟骨細胞に対する炎症抑制効果およびマクロファージ化への影響の変化について評価した。さらに東海大学医学部附属病院整形外科の PRP 治療にて、調製直後の LPPRP もしくは APS のいずれかを投与した OAK 患者の臨床評価スコアを比較した。

先行研究と一致して、血小板活性化率を示す CD62P 値は fPRP で有意に高く、融解温度が高いほど活性化率が上昇する傾向にあった。血小板は遠心分離及び遠心速度によっても活性化することが報告されているが、LPPRP, APS とともに調製過程 (WB, 1st, utPRP) において有意差は認めなかった。この結果の理由として、添付の手順書において遠心後血小板凝集塊が確認された場合、静置や軽くタッピングするなどして活性化した血小板を鎮静化させて凝集塊を崩してから次の手順を行うよう推奨されているため、PRP を回収し測定する時点では活性化が沈静化していることが考えられる。また LPPRP は赤血球・白血球がほとんど含まれない一方、APS には赤血球・白血球は多量に含まれるが、utPRP と fPRP の血小板活性化率を比較すると傾向に差のないことから、PRP 中の血球細胞種は凍結融解による血小板の活性化に影響しないことが示唆された。液性因子定量の結果、LPPRP, APS いずれにおいても複数の因子で utPRP と fPRP の間に有意差を認めた。また先行研究と一致して、VEGF や HGF は有意差を認めなかった一方、fPRP において utPRP と比較して TGF β 濃度が減少した。本研究では遊離活性 TGF β のみを測定したため、凍結融解が活性の低下に寄与した可能性がある。fPRP において utPRP と比較して IL1RA, IL4, IL13, およびその他の白血球由来因子濃度が有意に

高く、これは LPPRP にわずかに含まれる白血球に凍結融解が影響したことによると考えられる。これらの結果は、凍結融解が PRP に含まれる血球細胞を刺激し、有効性に影響を与える液性因子含有量が変化させる可能性を示唆している。

次に我々は、TKA 時廃棄組織より単離した滑膜細胞と軟骨細胞を用いて、PRP の炎症抑制効果を評価した。滑膜細胞における IL6・MMP13 産生と軟骨細胞における IL6 発現においていずれも fLPPRP が LPPRP と比較して有意に低値であった。一方、APS においては、APS が fAPS と比較して滑膜細胞における IL6, IL12, MMP13 発現と軟骨細胞における MMP3 発現において低値であった。これらの結果は、PRP の有効性を評価する際に凍結および活性化を含む PRP の性状を考慮することの重要性を示している。軟骨細胞における軟骨関連遺伝子の発現については、utPRP と fPRP の両方で Col1、ACAN、SOX9、RUNX2 について同様の結果が観察され、凍結は軟骨細胞に対する PRP の同化・異化に関する効果に影響を与えないことが示された。遺伝子発現と液性因子産生が一致していないが、タンパク質の産生は様々な転写後調節によって制御されており、先行研究においてより長期間培養で液性因子量の低下も報告されていることから、本研究で実施した 48 時間の培養は適切に評価するには短すぎた可能性がある。さらに、測定されたタンパク質はすべて PRP 中に存在することが知られているため、培養容器中に PRP が残存している可能性も排除できない。

マクロファージはすべての組織に存在する免疫細胞であり、膝関節においては滑膜や関節液中への存在が報告されている。組織の恒常性の維持や免疫応答に関与しており、周囲の微小環境に応答して異なる表現型に極性化することが知られている。Classically activated macrophage (M1 マクロファージ; M1) は IFN γ , TNF α , LPS などの刺激を受けて極性化し、炎症性サイトカインを放出して組織障害や炎症の促進に関与する一方、Alternatively activated macrophage (M2 マクロファージ; M2) は IL4, IL10, IL13 などの刺激を受けて抗炎症サイトカインを放出し、炎症の抑制や組織修復に関与する。

utPRP と fPRP のマクロファージ極性化に関与する液性因子の濃度を比較すると、M1 への極性化に関与する IFN γ や TNF α , M2 への極性化に関与する IL4, IL10, IL13 などは fPRP が utPRP と比較して高濃度な傾向にあった。MDM と M1 の両方で、PRP の添加により M1 マクロファージ細胞表面マーカーが維持または減少する一方、M2 マクロファージ細胞表面マーカーが増加する傾向にあった。fPRP におけるこれらの結果は、先行研究と矛盾しない。さらに、LPPRP・APS とともに M1 産生因子である TNF α の発現は fPRP がより低下させる一方、M2 産生因子である IL10 の発現は utPRP がより促進していた。これらのことから、PRP の凍結融解は特にマクロファージの液性因子産生に影響を及ぼすが、utPRP, fPRP いずれも M1 マクロファージへの極性化を阻害し、M2 マクロファージへの極性化を促進する可能性が示唆される。PRP を凍結融解することにより M1 極性化関連因子が増加するものの、それを上回る M2 関連因子の増加が観察されており、のことが M2 への極性化の促進に寄与していると考えられる。

JKOOS は変形性関節症等の被験者の短期的および長期的な症状と機能の評価することを目的とした患者立脚型の評価スコアであり、Symptoms, Pain, Activity, Sports, QOL の 5 項目および総合点 (Total Score) からなる。また OMERACT-OARSI Responder Criteria は JKOOS 等のスコアを用い当該治療が有効であったかを判断するものであり、Responder Rate は Responder と判定された被験者の割

合を示している。LPPRPもしくはAPSを投与した被験者のPRP投与前および投与後1, 3, 6, 12か月のスコアおよび変化量について、LPPRP, APS共に全Subscaleでスコアが投与後上昇していたが、特にPainの変化量がLPPRPとAPSで異なる傾向にあった。Responder Rateの解析を行うと、LPPRP投与では投与後1か月時点は約30%の反応者割合であり、3か月で一度低下するものの6, 12か月で回復し最高割合となっている一方、APS投与では投与後1か月で約50%の反応者割合であり、12か月時点で微増していた。これはPRP中の液性因子量と標的細胞への影響の差異が影響していると考えられるAPSがLPPRPと比較して高濃度であった因子について、抗炎症効果を持つIL10は約20倍、IL1RAは約100倍であり、LPPRPがAPSと比較して高濃度であった因子は組織再生に報告の多いTGF β が約3倍、マクロファージの誘導と極性化に関与するGM-CSF約6倍であった。標的細胞への影響の検証でもLPPRPとAPSで変動が異なるマーカーが確認されている。

本研究のLimitationとしては、以下が挙げられる。サンプルサイズが小さいこと。保管期間が短いこと。基礎研究において健常者末梢血から調製したPRPのみを使用している。WasaiらがOAK患者由来PRPと健常者由来PRPでは液性因子量が異なることを報告している。軟骨細胞、滑膜細胞はTKA時廃棄組織から、単球は健常者から細胞を単離しており、細胞のドナーと培養液に添加したPRPのドナーが一致していない。PRP中の血小板の活性が培養添加後に変化している可能性があるが、本研究において測定していない。またLPPRPは約6.0mL、APSは約2.5mL調製され、臨床においては膝関節腔内に全量投与される一方、本基礎研究においては培養液に同量添加している。臨床評価スコアにおいては自由診療での実施のため、患者背景、OAKの重症度や病態、併用薬等のばらつきが大きい。最後に、OAKモデル動物を用いたin vivo試験を実施していないため、組織間の影響等は考慮できていない。

今後は、PRPの調製方法に伴う成分の差異とそれぞれの凍結融解に伴う治療効果への影響を検討し、臨床応用において最適なPRPの調製方法や使用方法を確立することが求められる。これらの知見は、OAK患者に対するPRPの有効性の向上並びに適正使用に貢献する可能性がある。

【Conclusion (結論)】

本研究において調製直後のPRPと凍結融解を経たPRPを比較した結果、血小板活性化率と液性因子含有濃度に差があり、PRPの性状によりPRPの効果に対する凍結融解の影響が異なることが明らかとなった。凍結融解がPRP中の血小板等の血球細胞への刺激となり、PRP中の液性因子量が変わることで、軟骨細胞・滑膜細胞に対する炎症抑制効果やマクロファージ極性化に対する影響に差異が生じたと考えられる。この結果はPRP治療の有効性向上、普及、適正使用に貢献し、さらには患者ごとの最適なPRPの選択に寄与する可能性がある。